

18/8/5

REC'D 09 JUN 1999	
WIPO	PCT

**OFICINA ESPAÑOLA**

de

**PATENTES y MARCAS**

# **CERTIFICADO OFICIAL**

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9801003, presentada en este Organismo, con fecha 13 de Mayo de 1998.

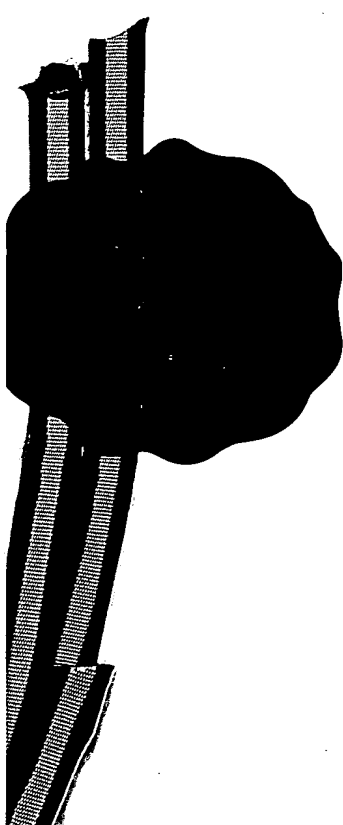
Madrid, 21 de mayo de 1999

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

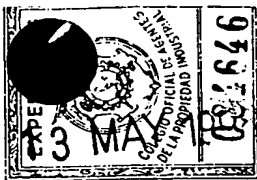
P.D.



M. MADRUGA



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



R. - 99043  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(1) <input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD ..... NUMERO SOLICITUD ..... FECHA SOLICITUD ..... MODALIDAD ..... NUMERO SOLICITUD ..... FECHA SOLICITUD .....
--	--

NUMERO DE SOLICITUD

P 9801003

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.

98 MAY 13 12:36

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO  
MADRID [2,8]

(4) SOLICITANTE(S) APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA NOMBRE DNI

INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Dpto. SECRETARIA GENERAL  
REPROGRAFIA  
Panamá, 1 - Madrid 28071

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO Avenida Pio XII, 53  
LOCALIDAD 31008 Pamplona  
PROVINCIA Navarra  
PAIS RESIDENCIA España  
NACIONALIDAD española

TELEFONO .....  
CODIGO POSTAL .....  
CODIGO PAIS [E,S]  
CODIGO NACION [E,S]

(6) INVENTOR(ES) (7) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR  
☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR (8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO  
☒ INVENC. LABORAL ☒ CONTRATO ☐ SUCESION

APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
1) Prieto Valtueña	Jesús	española	ES
2) Civeira Murillo	Pilar	"	ES
3) Larrea Leoz	Esther	"	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION

"USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES"

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P. ☐ SI ☒ NO

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR ..... FECHA .....

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P. ☐ SI ☒ NO

(14) REPRESENTANTE APELLIDOS ELZABURU MARQUEZ NOMBRE ALBERTO CODIGO [2,3,2,1]

DOMICILIO Miguel Angel, nº 21 LOCALIDAD MADRID PROVINCIA MADRID COD. POSTAL [2,8,0,1,0]

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

☒ DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS... 25  
☒ REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS... 2  
☒ DIBUJOS. N.º DE PAGINAS... 3  
☒ RESUMEN  
☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD  
☐ TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD  
☒ DOCUMENTO DE REPRESENTACION  
☐ PRUEBAS  
☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS  
☐ HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS  
☒ OTROS

FIRMA DEL FUNCIONARIO

*[Firma]*

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

Alberto de Elzaburu  
por mi compañero

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS



# PATENTE

## RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD

P 9 8 0 1 0 0 3

FECHA DE PRESENTACION

13 MAY 1998  
13 MAY 1998

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Uso del interferon alfa 5 en el tratamiento de las hepatopatías virales.

La invención describe la síntesis disminuida de IFN $\alpha$ 5 en hígados de pacientes con hepatitis C, frente a hígados de controles sanos. El subtipo de IFN expresado en dichos hígados sanos, correspondió únicamente al subtipo alfa 5, frente a los diferentes subtipos expresados en hígados enfermos. En SEQ ID NO:1 se muestra la secuencia parcial de cADN correspondiente a IFN $\alpha$ 5. Estas diferencias significativas entre los patrones d expresión de unos hígados y otros ponen de manifiesto la importancia del uso de este subtipo de interferon en la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento d hepatopatías de origen viral. En la invención se describ pormenorizadamente esta utilización bajo diferentes formas y procedimientos, incluyendo aquellos que utilizan la producción de proteínas recombinantes, a partir de secuencias tipo SEQ ID NO:1.

GRAFICO



(31) NÚMERO

(32) FECHA

(33) PAÍS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN

13 de Mayo de 1998

P 9801003

(71) SOLICITANTE(S)

NACIONALIDAD española

INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A.

DOMICILIO

Avenida Pio XII, 53, 31008 Pamplona, Navarra, España

(72) INVENTOR(ES)

Jesús Prieto Valtueña, Pilar Civeira Murillo y Esther Larrea Leoz

(73) TITULAR(ES)

(11) N° DE PUBLICACIÓN

(45) FECHA DE PUBLICACIÓN

(62) PATENTE DE LA QUE  
ES DIVISIONARIA

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TÍTULO

"USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATA  
MIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES"

(57) RESUMEN (APORTACIÓN VOLUNTARIA, SIN VALOR JURÍDICO)

Uso del interferon alfa 5 en el tratamiento de las  
hepatopatías virales.

La invención describe la síntesis disminuida de IFN $\alpha$ 5 en  
hígados de pacientes con hepatitis C, frente a hígados de  
controles sanos. El subtipo de IFN expresado en dichos hígados  
sanos, correspondió únicamente al subtipo alfa 5, frente a los  
diferentes subtipos expresados en hígados enfermos. En SEQ ID  
NO:1 se muestra la secuencia parcial de cADN correspondiente a  
IFN $\alpha$ 5. Estas diferencias significativas entre los patrones de  
expresión de unos hígados y otros ponen de manifiesto la  
importancia del uso de este subtipo de interferon en la  
fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de  
hepatopatías de origen viral. En la invención se describe  
pormenorizadamente esta utilización bajo diferentes formas y  
procedimientos, incluyendo aquellos que utilizan la producción  
de proteínas recombinantes, a partir de secuencias tipo SEQ ID  
NO:1.

## USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES

### Ambito de la invención

5

La invención se relaciona con la producción de interferon alfa 5 para su utilización en composiciones útiles en el tratamiento de las hepatopatías de origen viral.

10 Hemos comprobado que el IFN-alfa 5 es el único subtipo de interferon alfa producido en el hígado sano y que sus niveles se encuentran claramente descendidos en la hepatitis crónica C lo que pone de manifiesto el valor terapéutico de esta sustancia en el tratamiento de esta enfermedad y de otras hepatitis víricas. Al conocerse la secuencia  
15 génica codificante de este interferon, la producción del mismo por tecnología de ADN recombinante en diferentes huéspedes, permite el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de este tipo de hepatopatías, en sus diferentes fases de evolución.

20

### Estado de la técnica anterior

Las células infectadas pueden reconocer la presencia de virus iniciando señales que llevan a la transcripción y  
25 secreción de interferon tipo I ( $\text{IFN}\alpha$  e  $\text{IFN}\beta$ ). El  $\text{IFN}\alpha$  es una familia de 13 polipéptidos (subtipos) codificados por diferentes genes. El  $\text{IFN}\beta$  es una glicoproteína producida por un único gen. Diversos tipos celulares producen tanto  $\text{IFN}\alpha$  como  $\text{IFN}\beta$  (1,2).

30 La infección viral es el principal estímulo para la producción de interferon tipo I, aunque también existen otros factores que pueden aumentar su síntesis, como son componentes bacterianos, RNA de doble cadena, factores de crecimiento y otras citoquinas (1). Además de la acción antiviral del  $\text{IFN}\alpha$ , éste puede interactuar con ciertas cito-  
35

quinas y con las células T regulando el crecimiento y diferenciación de las células del sistema inmune (3). Los genes del IFN $\alpha$  son expresados constitutivamente en tejidos humanos de individuos sanos (4), aunque la expresión de determinados subtipos está restringida a ciertos tipos celulares (5,6). La inducción de IFN por virus es regulada principalmente a nivel transcripcional. La activación transcripcional específica ocurre por la interacción de factores celulares inducidos por virus con los dominios reguladores de los promotores de los genes del IFN $\alpha$ . (7).

Todos los subtipos de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  poseen un receptor común en la superficie de las células. Ensayos de competición de unión al receptor de diversos subtipos de IFN $\alpha$  indican que todos ellos se unen al mismo receptor, pero con diferente afinidad (8). La actividad biológica de los diferentes subtipos de IFN $\alpha$  es poco conocida. Los subtipos de interferon IFN $\alpha$ 5 e IFN $\alpha$ 8 parecen ser los que tienen mayor actividad antiviral. La respuesta antiproliferativa también es diferente entre los diversos subtipos (9). En humanos, las células mononucleares de sangre periférica no estimuladas expresan diversos subtipos de IFN $\alpha$  (10).

Un mecanismo común de persistencia de la infección viral es la evasión del sistema del IFN. Muchos virus han desarrollado estrategias para evitar los efectos antivirales del IFN. Concretamente, un defecto selectivo en la producción de IFN $\alpha$  ha sido descrito en monocitos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (11).

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus RNA de cadena sencilla que conlleva a una infección crónica en más de dos tercios de las personas infectadas. La prevalencia de infección por el VHC es alrededor del 2 al 3% en la población occidental. Estudios desarrollados en Europa muestran que el 33% de los pacientes con infección crónica por el VHC desarrollan cirrosis en un tiempo medio inferior a 20 años (12). Una proporción significativa de estos

pacientes desarrollan cáncer hepático, con una incidencia anual del 1,4% (13). Ha sido difícil encontrar la razón del alto grado de persistencia de la infección por el VHC. La alta tasa de mutaciones del virus y la producción de un perfil predominante de citoquinas Th2 respecto a Th1 han sido descritas como las responsables de este alto grado de persistencia de la infección. El tratamiento con IFN induce una respuesta sostenida en alrededor del 30% de los pacientes con hepatitis crónica C. El mecanismo responsable de respuesta o no respuesta al tratamiento con IFN es poco conocido.

El sistema del IFN apenas ha sido estudiado en la infección crónica por el VHC. No existe un modelo animal apropiado de infección crónica por el VHC, por ello, los estudios realizados en humanos son la única fuente de información sobre la patofisiología y patogénesis de la hepatitis crónica C. En la presente invención se describe la expresión de los genes  $IFN\alpha$  e  $IFN\beta$  en hígado y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de controles sanos y pacientes con hepatitis crónica C. Además, hemos analizado el subtipo de  $IFN\alpha$  expresado en tejido hepático normal y tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C. La expresión de los diferentes subtipos de  $IFN\alpha$  también fue analizada en CMSP de controles sanos y de pacientes con hepatitis crónica C.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Maeyer E, Maeyer-Guignard J. Interferons. In Thomson A, ed. The Cytokine Handbook. London: Academic Press Limited 1991: 215-239.
2. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferon. Interferon-Regulated Cellular Proteins and Their Surprisingly Selective Antiviral Activities. Virology 1991; 183: 1-11.



3. Tilg H. New Insights Into the Mechanisms of Interferon Alfa: An Immunoregulatory and Anti-inflammatory Cytokine. *Gastroenterology* 1997; 112: 1017-1021.
- 5 4. Tovey MG, Streuli M, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarho J, Vignaux F and Gigou M. Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 5038-5042.
- 10 5. Bisat F, Raj NB, Pitha PM. Differential and cell type specific expression of murine alpha interferon genes is regulated on the transcriptional level. *Nucleic Acids Res* 1988;16:6067-6083.
- 15 6. Hiscott J, Cantell K, Weissmann C. Differential expression of human interferon genes. *Nucleic Acids Res* 1984;12:3727-3746.
- 20 7. Au WC, Su Y, Raj NBK and Pitha PM. Virus-mediated Induction of Interferon A Gene Requires Cooperation between Multiple Binding Factors in the Interferon  $\alpha$  Promoter Region. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 24032-24040.
- 25 8. Aguet M, Grobke M, Dreiding P. Various human interferon alpha subclasses cross-react with common receptors: their binding affinities correlate with their specific biological activities. *Virology* 1984;132:211-216.
- 30 9. Foster GR, Rodrigues O, Ghouze F, Schulte-Frohlinde D, Testa D, Liao MJ, Stark GR, Leadbeater L, Thomas HC. Different relative activities of human cell derived interferon-alpha subtypes: interferon alpha 8 has very high antiviral potency. *J Interferon and Cytokine Res.* 1996;16:1027-1033.
10. Brandt ER, Linnane AW, Devenish RJ. Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1994; 86:717-725.
- 35 11. Gendelman HE, Friedman RM, Joe S, Baca LM, Turpin JA, Dveksker G, Meltzer MS and Dieffenbach C. A Selective Defect of Interferon  $\alpha$  Production in Human Immuno-

- deficiency Virus-infected Monocytes. The Journal of Experimental Medicine 1990; 172: 1433-1442.
12. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Lancet 1997; 349:825-832.
13. Fattovich G, Giustina G, Degos F et al. Morbidity and Mortality in Compensated Cirrhosis Type C: A Retrospective Follow-Up Study of 384 Patients. Gastroenterology 1997;112: 463-472.
14. Gil B; Qian Ch; Riezu-Boj JI, Civeira MP; Prieto J. Hepatic and extrahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C: different patterns of response to interferon treatment. Hepatology 1993;18:1050-1054.
15. Lopez S, Reeves R, Island ML, Bandu MT, Christeff N, Doly J and Navarro S. Silencer Activity in the Interferon-A Gene Promoters. The Journal of Biological Chemistry 1997; 272: 22788-22799.
16. Knodell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan T, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981; 1:431-435.
17. Chomczynsky P; Sacchi N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987;162:156-159.
18. Weissmann C, Weber H. The interferon genes. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1986; 33:251-300.
19. Goeddel DV, Leung DW, Dull TJ, Gross M, Lawn RM., McCandliss R, Seeburg PH, Ullrich A, Yelverton E, Gray PW. The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. Nature 1981; 290:20-26.
20. Derynck R, Content J, DeClercq E, Volckaert G, Tavernier J, Devos R, Fiers W. Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. Nature 1980; 285:542-547.

21. Ng SY, Gunning P, Eddy R, Ponte P, Leavitt J, Shows T, Kedes L. Evolution of the functional human b-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. Mol Cell Biol 1985; 5:2720-2732.
22. Larrea E, Garcia N, Qian Ch, et al. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Gene Expression And The Response To Interferon In Chronic Hepatitis C. Hepatology 1996; 23: 210-217.
23. Viazov S; Zibert A; Ramakrishnan K; Widell A; Cavicchini A; Schreier E; Roggendord M. Typing of hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay. J. Virol. Methods 1994;48:81-92.
24. Sarobe P, Jauregui JI, Lasarte JJ, García N, Civeira MP, Borrás-Cuesta F and Prieto J. Production of interleukin-2 in response to synthetic peptides from hepatitis C virus E1 protein in patients with chronic hepatitis C: relationship with the response to interferon treatment. J Hepatol 1996;25:1-9.

## 20 DESCRIPCION DE LA INVENCION

### **Pacientes y controles**

La expresión génica de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  fue analizada en muestras de biopsias hepáticas de 16 pacientes con hepatitis crónica C (9 hombres y 7 mujeres, rango de edad de 24 hasta 71 años). Cinco de estos pacientes presentaban cirrosis. El genotipo viral se determinó en 14 pacientes y resultó ser 1b en 10 pacientes, 1a en 2 pacientes y genotipo 3 en 1 paciente.

Además, la expresión génica de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  fue determinada en 12 muestras de hígado normal obtenidas mediante laparatomía de 12 pacientes control (9 hombres y 3 mujeres, rango de edad de 49 hasta 70 años). La laparatomía fue realizada debido a la presencia de tumores digestivos en 10 pacientes (4 de colon-recto, 5 gástricos y 1 pancreático), debido a pancreatitis crónica en 1 paciente y a la presen-

cia de quiste hiatídico en otro paciente. En los doce casos la histología hepática era normal. Ninguno de estos casos control había recibido tratamiento previamente a la obtención de la muestra hepática.

5 Los niveles de RNAm de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  también fueron determinados en CMSP de 25 pacientes con hepatitis crónica C (14 hombres y 11 mujeres, rango de edad de 24 hasta 69 años) (cuatro de estos pacientes presentaban cirrosis) y en  
10 CMSP de 23 controles sanos (10 hombres y 13 mujeres, rango de edad de 25 hasta 66 años). El genotipo viral de estos pacientes era 1b en 22 pacientes, 1a en dos pacientes y 3 en 1 paciente.

El diagnóstico de hepatitis crónica C se basó en una elevación de transaminasas séricas durante más de 6 meses,  
15 positividad para los anticuerpos anti-VHC (ELISA 2ª generación, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA), presencia de RNA del virus C en suero (transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa), y evidencia histológica de hepatitis crónica. La severidad del daño hepático fue evaluado por el índice de Knodell (16). Fueron excluidas otras  
20 causas de hepatitis crónica diferentes al virus de la hepatitis C. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con IFN $\alpha$  durante, al menos, los 6 meses previos al estudio.

25

#### **Preparación de las muestras hepáticas, CMSP y suero**

Las muestras hepáticas fueron obtenidas mediante biopsia hepática realizada con aguja de biopsia Tru-Cut (Baxter, Deerfield, IL). Un tercio de la muestra se congeló  
30 inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta la extracción del RNA total. El resto de la muestra se utilizó para el estudio histológico.

Las CMSP se aislaron a partir de sangre heparinizada mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep (Nycomed  
35 Pharma As, Oslo, Noruega), centrifugadas a 600 g durante 30 minutos. Después de la centrifugación, las CMSP fueron re-

cogidas, lavadas 5 veces con ClNa al 0,9% y lisadas con la solución desnaturizante de proteínas Ultraspec™ (Biotech Laboratories, Houston, USA). El lisado celular fue guardado a -80°C hasta la extracción del RNA total que fue realizada según el método de Chomczynski y Sacchi (17).

Las muestras de suero fueron obtenidas mediante centrifugación a partir de sangre venosa recogida en tubos estériles. El suero se guardó a -40°C hasta su utilización.

#### 10 **Análisis de la expresión génica de IFN $\alpha$ e IFN $\beta$ en hígado y CMSP**

Los niveles de RNAm de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  fueron determinados mediante un método cuantitativo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando un termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400). Previamente a la transcripción reversa, 2  $\mu$ g de RNA total (tanto de hígado como de CMSP) fueron tratados con 1 unidad de desoxirribonucleasa (DNase I amplification grade, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) para eliminar el posible DNA contaminante. La presencia de trazas de DNA fue chequeada incluyendo reacciones control sin transcripción reversa. Este paso es requerido debido a la ausencia de intrones en los genes de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  (18), lo que nos hace indistinguible el producto de PCR procedente del RNA o del posible DNA contaminante. Todos los controles realizados sin transcripción reversa fueron negativos, indicando ausencia de DNA contaminante. El RNA total fue transcrito (60 minutos a 37°C) con 400 unidades de M-MuLV transcriptasa reversa (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md, USA) en un volumen final de 40  $\mu$ l de solución salina 5x (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), suplementado con 5mM DTT, 0,5mM desoxirribonucleótidos trifosfato (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), 48 unidades inhibidor de RNAsas (Promega Corporation, MD, US) y 400 ng de hexámeros aleatorios (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Después de desnaturizar la transcriptasa reversa (95°C, 1 minuto) y

rápidamente enfriar sobre hielo, una alícuota de 10 µl (0,5 µg) del cDNA fue utilizada para la amplificación de IFNα e IFNβ por PCR en 50 µl de 10x bufer de PCR (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween 20) suplementado con los  
5 cebadores sentido y antisentido (40 ng de cada uno para IFNα y 60 ng para IFNβ), 1,2 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 unidades de Biotaq™ DNA polimerasa (Bioline, Londres, UK). En todos los experimentos fueron realizadas reacciones control sin RNA. Como control interno de cada muestra se realizaron ampli-  
10 caciones de un fragmento de cDNA β-actina, utilizando una alícuota de 10 µl del cDNA obtenido anteriormente. El IFNα fue amplificado realizando 30 o 33 ciclos (CMSP o hígado respectivamente) (94°C, 60°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente), el IFNβ fue amplifi-  
15 cado realizando 30 o 35 ciclos (CMSP o hígado respectivamente) (94°C, 58°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente) y la β-actina fue amplificada realizando 18 o 25 ciclos (PBMC o hígado respectivamente) (94°C, 55°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso  
20 respectivamente), protocolos que evitan interferencias con la fase de saturación de la reacción de PCR. Los oligonucleótidos (5'-3') d(TCCATGAGATGATCCAGCAG) y d(ATTCTGCTCTGACAACCTCCC) fueron utilizados como cebadores  
25 sentido y antisentido, respectivamente, para amplificar un fragmento de 274 pares de bases localizado entre los nucleótidos 240-514 del gen humano del IFNα (19). Estos oligonucleótidos son cebadores consenso diseñados para amplificar todos los subtipos de IFNα. Los oligonucleótidos d(TCTAGCACTGGCTGGAATGAG) y d(GTTTCGGAGGTAACCTGTAAG) fueron  
30 los cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 276 pares de bases localizado entre los nucleótidos 349-625 del cDNA del IFNβ humano (20). d(TCTACAATGAGCTGCGTGTG) y d(GGTGAGGATCTTCATGAGGT) fueron los cebadores utilizados

para amplificar un fragmento de 314 pares de bases (nucleótidos 1319-2079) del gen de la  $\beta$ -actina (21).

Después de las reacciones de amplificación, 20  $\mu$ l del producto de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta y fueron analizadas con un programa comercial (Molecular Analyst/PC, Bio-Rad), capaz de digitalizar y analizar la imagen obtenida. Finalmente, los valores correspondientes a la expresión génica del IFN $\alpha$  o IFN $\beta$  fueron normalizados con sus correspondientes de  $\beta$ -actina. Los resultados se expresaron como el cociente entre el valor de IFN $\alpha$  o IFN $\beta$  y el correspondiente de  $\beta$ -actina. Previamente, nosotros demostramos que el RNAm de  $\beta$ -actina se expresaba constantemente tanto en hígado como en CMSP de pacientes con hepatitis crónica C (22), lo que nos permite normalizar los valores de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  con los obtenidos de  $\beta$ -actina.

Se realizaron curvas de validación de la técnica de PCR partiendo de cantidades conocidas de RNA total (de 0 hasta 1  $\mu$ g). Como se observa en la figura 3, con las cantidades de RNA total inicial utilizadas para IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  o  $\beta$ -actina (0,5  $\mu$ g, tanto en hígado como en CMSP), nos encontramos en el rango lineal de la curva de amplificación de la PCR. El coeficiente de variación interensayo para IFN $\alpha$ / $\beta$ -actina fue 22% y para IFN $\beta$ / $\beta$ -actina fue 24%. Se comprobó la identidad del producto de PCR obtenido para IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  mediante secuenciación automática (ABI PRISM<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer).

### 30 Identificación de los subtipos de IFN $\alpha$

La extracción de RNA total, transcripción reversa y reacción de PCR se realizó como describimos anteriormente, utilizando los cebadores consenso de IFN $\alpha$  mencionados. El

producto de PCR obtenido fue clonado utilizando el kit comercial de clonaje TOPO TA (Invitrogen, Leek, Holanda). Al menos 6 clones de cada inserto fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Foster, CA), utilizando el kit de secuenciación Dye Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Forter CA).

#### **Detección, cuantificación y genotipaje del RNA del virus C**

10 La presencia del RNA del virus C en suero se determinó mediante la técnica de RT-PCR (14, 22), utilizando 2 pares de cebadores específicos de la región 5' no codificante del genoma del virus C. El RNA del virus C fue cuantificado mediante la técnica de PCR competitiva descrita por nosotros anteriormente (22). El genotipo viral fue determinado siguiendo el método de Viazov (23) y como anteriormente ya fue descrito (22,24). Para determinar el genotipo 4 se utilizó la sonda 5'G(A,G)CCGTCTTGGGGCC(A,C)AAATGAT.

#### **20 Análisis estadístico**

Los resultados de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  son presentados como la media  $\pm$  error standard. La normalidad de las variables fue estudiada con el test de Shapiro-Wilks. El análisis estadístico de los valores de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  en CMSP o hígado se realizó con test no-paramétricos (Mann-Whitney U test) o paramétricos (T de Student). La asociación entre variables cuantitativas fue estudiada con el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según correspondía. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS 6.0 de Windows.

#### **Producción de proteína recombinante**

##### Expresión y purificación de interferon- $\alpha$ 5 humano en *escherichia coli*:



A pesar de que la expresión de cDNAs procedentes de organismos eucariotas en *Escherichia coli* asegura, en general, un alto nivel de producción, el aislamiento y purificación de la proteína de interés implica procedimientos complejos así como bajos rendimientos. Por esta razón, se utilizan vectores de expresión que facilitan la obtención de proteínas de fusión cuya purificación se reduce a un paso de cromatografía de afinidad, de alto rendimiento y eficacia.

10

Construcción del vector de expresión y obtención de bacterias recombinantes

El cDNA que codifica para el interferón- $\alpha 5$  se clonará en el vector pET14b (disponible comercialmente, Novagen). Este vector proporciona una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina (1 kDa) y que se traducirán en fase con el cDNA clonado para rendir una proteína de fusión que contendrá en su extremo amino terminal una cola de histidinas de 1 kDa y a continuación el interferón- $\alpha 5$ , con un sitio de corte por trombina entre ambos.

20

Una vez obtenido el vector de expresión, se prepararán bacterias competentes de la cepa BL21(DE3) ya que esta cepa contiene un gen inducible de la RNA polimerasa de T7, que será un requisito necesario para la posterior producción de proteína. Las bacterias competentes se transformarán con el vector obtenido previamente (pET14b con el cDNA del interferón- $\alpha 5$  clonado). Las bacterias transformadas se seleccionarán por su crecimiento en medio LB con ampicilina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

30

Expresión y purificación del interferón- $\alpha 5$ :

Las bacterias transformadas se crecerán en medio LB con ampicilina a 37°C hasta una densidad óptica de 0,4 a 600 nm. A continuación se inducirá la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de

35

0.5 mM. De esta forma se induce el promotor *lac* y como consecuencia, el promotor de la RNA polimerasa de T7 que contiene el vector y que regula la expresión del cDNA clonado. El cultivo se crecerá 4 horas más en las mismas condiciones.

Para obtener los extractos, una vez crecidas las bacterias, se centrifugarán a 4°C. Las bacterias precipitadas se resuspenderán en un tampón Tris/HCl 10 mM, sacarosa 10%, 2-mercaptoetanol 2 mM e inhibidores de proteasas. La homogeneización se realizará por sonicación tras una incubación de 30 minutos con lisozima a 4°C. Esto permitirá romper la pared bacteriana y mejorar el rendimiento del proceso de extracción. El extracto citosólico se obtendrá a partir de la centrifugación del homogenado a 100.000 x g durante 90 minutos. La producción de proteína se verificará mediante el análisis de la fracción citosólica por SDS-PAGE.

La purificación de la proteína de fusión His-interferón- $\alpha$ 5 se purificará mediante la cromatografía del extracto citosólico en una columna de Níquel de 2 ml. Tras el lavado de la columna, la proteína se eluirá con 1 M imidazol. La proteína pura se procesará con trombina y el interferón- $\alpha$ 5 se repurificará posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular.

#### Expresión y purificación de interferón- $\alpha$ 5 humano en *Solanum tuberosum*:

Construcción del vector de expresión y obtención de plantas transgénicas

El cDNA que codifica para el interferón- $\alpha$ 5 se clonará en un vector de expresión de *Agrobacterium tumefaciens*. Este vector contiene el promotor de la patatina (proteína más abundante en el tubérculo de *Solanum tuberosum*), además de una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina (1 kDa) y que se traducirán en fase con el cDNA

clonado para rendir una proteína de fusión que contendrá en su extremo amino terminal una cola de histidinas de 1 kDa y a continuación el interferon- $\alpha$ 5, con un sitio de corte por trombina entre ambos.

- 5        Una vez obtenido el vector de expresión, se prepararán bacterias competentes de la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias competentes se transformarán con el vector obtenido previamente. Las bacterias transformadas se seleccionarán por su crecimiento en medio LB con  
10 kanamicina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

Posteriormente se realizará un cocultivo de las bacterias transformadas con el material vegetal (hojas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro*) y se seleccionarán las  
15 células vegetales resistentes a kanamicina. Estas células se regenerarán hasta la obtención de plantas transgénicas.

#### Obtención y purificación del interferón- $\alpha$ 5:

- Se realizará una extracción de proteína total a partir  
20 de tubérculos de las plantas transgénicas que expresen el interferon- $\alpha$ 5.

La purificación de la proteína de fusión His-interferon- $\alpha$ 5 se realizará mediante la cromatografía del  
extracto proteico obtenido en una columna de Níquel de 2  
25 ml. Tras el lavado de la columna, la proteína se eluirá con 1 M imidazol. La proteína pura se procesará con trombina y el interferon- $\alpha$ 5 se repurificará posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular.

#### 30    **Subtipos de IFN $\alpha$ en tejido hepático normal y CMSP d individuos sanos**

Después de la extracción del RNA total de las muestras de tejido hepático normal, el RNAm del IFN $\alpha$  fue amplificado utilizando cebadores universales para todos los subtipos de

IFN $\alpha$ . Posteriormente, los productos de amplificación de PCR fueron clonados y secuenciados. Se analizaron 41 clones de cuatro hígados normales diferentes y observamos que la secuencia de IFN $\alpha$  de los 41 clones era la misma y correspondía al subtipo IFN $\alpha$ 5 (Tabla 1). Estos resultados muestran que el IFN $\alpha$ 5 es el único subtipo de IFN $\alpha$  expresado en hígado normal. La secuencia parcial de cADN de IFN alfa 5 obtenida para todos los clones se muestra como SEQ ID NO:1.

Para comparar el perfil de subtipos de IFN expresados en el hígado con el expresado en CMSP, se extrajo el RNA total de CMSP de 5 controles sanos y se amplificó el RNAm de IFN $\alpha$  con los cebadores universales de todos los subtipos de IFN $\alpha$ . De los 43 clones analizados, 15 correspondían al subtipo IFN $\alpha$ 5, 14 al IFN $\alpha$ 1/13, 6 al IFN $\alpha$ 21 y 8 clones a otros subtipos de IFN $\alpha$  (Tabla 1). Estos resultados indican que el perfil de subtipos de IFN $\alpha$  expresado en CMSP difiere del expresado en hígado normal.

#### **Subtipos de IFN $\alpha$ en tejido hepático y CMSP de pacientes con hepatitis crónica C**

Los resultados anteriores muestran que el hígado normal expresa IFN $\alpha$ 5, mientras que las CMSP expresan una variedad de subtipos de IFN $\alpha$ . En el parénquima hepático de pacientes con hepatitis crónica C existe infiltrado de células mononucleares, siendo éstas una fuente importante de IFN $\alpha$ . Ello sugiere que el perfil de subtipos de IFN $\alpha$  expresado en el hígado de pacientes con hepatitis crónica C podría diferir del perfil encontrado en hígado normal. Para estudiar la expresión de subtipos de IFN $\alpha$  en la hepatitis crónica C, extrajimos el RNA total de muestras hepáticas de 3 pacientes diferentes y de 2 muestras de CMSP. Después de amplificar el RNAm de IFN $\alpha$  con cebadores universales para todos los subtipos, clonamos y secuenciamos 24 clones de

tejido hepático y 18 clones de CMSP. Como se muestra en la tabla 1, las CMSP de pacientes con hepatitis crónica C expresan IFN $\alpha$ 21, IFN $\alpha$ 5 y IFN $\alpha$ 7 (5, 12 y 1 clon respectivamente). En tejido hepático de estos pacientes encontramos  
5 además del subtipo IFN $\alpha$ 5, los subtipos IFN $\alpha$ 21, IFN $\alpha$ 17 y IFN $\alpha$ 1/13 (8, 1 y 2 clones respectivamente) (Tabla 1).

Estos datos sugieren que la producción de IFN $\alpha$  por el infiltrado de células mononucleares puede causar un cambio  
en el perfil de subtipos de IFN $\alpha$  expresados en el tejido  
10 hepático de pacientes con hepatitis crónica C.

#### Niveles de expresión de RNAm de IFN $\alpha$ en CMSP y en hígado de pacientes con hepatitis crónica C y controles

El RNA total fue extraído de muestras de CMSP e hígado  
15 de pacientes con hepatitis crónica C (n=25 y 16, respectivamente), de muestras de CMSP de controles sanos (n=20) y muestras de tejido hepático normal obtenidas mediante laparatomía (n=12). Los niveles de RNAm de IFN $\alpha$   
fueron determinados mediante la técnica semicuantitativa de  
20 transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando cebadores universales para amplificar todos los subtipos de IFN $\alpha$ . Los valores son expresados como el cociente entre el RNAm de IFN $\alpha$ /RNAm de  $\beta$ -actina.

Encontramos que los niveles de expresión de IFN $\alpha$  en  
25 CMSP de pacientes con hepatitis crónica C estaban significativamente aumentados comparados con los hallados en controles sanos ( $3,2 \pm 0,48$  vs  $1,14 \pm 0,26$ ;  $p=0,001$ ) (Fig.1A). Este resultado era esperado en una infección viral como la hepatitis C, en la que se encuentran infectadas las CMSP  
30 (14). Por el contrario, los niveles de expresión de RNAm de IFN $\alpha$  estaban significativamente disminuidos en tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C comparado con el

expresado en hígado normal ( $0,12 \pm 0,03$  vs  $0,43 \pm 0,12$ ;  $p=0,003$ ) (Fig 1B).

Como hemos observado anteriormente el IFN $\alpha$ 5 es el único subtipo de IFN $\alpha$  detectado en hígado normal, mientras que en tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C se observa una mezcla de subtipos. Nuestros hallazgos indican que en la infección por VHC existe una marcada reducción en la expresión del subtipo de IFN $\alpha$  constitutivamente expresado en el tejido hepático. Interessantemente, los niveles de RNAm de IFN $\alpha$  en hígado de pacientes con hepatitis crónica C muestran una correlación directa con el índice de Knodell ( $r=0,54$ ;  $p<0,05$ ). Este hallazgo, junto con la observación que los subtipos de IFN $\alpha$  detectados en hígado de pacientes con hepatitis crónica C son los observados en CMSP, sugiere que la mayor parte del RNAm de IFN $\alpha$  encontrado en hígado de hepatitis C proviene del infiltrado inflamatorio. Parece posible que la reducción en la expresión del IFN $\alpha$  hepático (IFN $\alpha$ 5) pueda jugar un papel en la cronificación de la infección por VHC. Por ello, estas observaciones pueden tener implicaciones terapéuticas si además tenemos en cuenta la marcada actividad antiviral y antiproliferativa el IFN $\alpha$ 5 descrita por otros autores (9).

#### **Niveles de expresión de RNAm de IFN $\beta$ en CMSP y en hígado de pacientes con hepatitis crónica C y controles**

El IFN $\beta$ , la segunda forma mayoritaria del interferón tipo I, es una glicoproteína producida por un único gen. En las infecciones virales, los genes de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  son activados o reprimidos transcripcionalmente a través de diversos mecanismos (15). Para analizar la expresión del IFN $\beta$  en la hepatitis crónica C determinamos los niveles de RNAm de IFN $\beta$  en las mismas muestras de tejido hepático y CMSP que previamente habíamos determinado la expresión de IFN $\alpha$ .

Como se muestra en la figura 2, observamos que los niveles de RNAm de IFN $\beta$  (expresados como cociente con sus respectivos de  $\beta$ -actina) eran significativamente más altos, tanto en CMSP como en hígado, de pacientes con hepatitis crónica C comparados con los hallados en CMSP de controles sanos e hígados normales ( $1,66 \pm 0,2$  vs  $0,88 \pm 0,16$ ;  $p=0,008$  en CMSP y  $1,37 \pm 0,23$  vs  $0,97 \pm 0,16$ ;  $p=0,011$  en hígado). Estos resultados muestran que mientras el VHC causa represión del IFN $\alpha$  en hígado, la expresión de IFN $\beta$  está aumentada tanto en hígado como en CMSP. Ello indica que el VHC modula de diferente forma los diferentes genes del IFN de tipo I en hígado, bloquea la producción de IFN $\alpha$  pero permite una sobreexpresión de IFN $\beta$ .

#### 15 Relación entre la expresión de los genes de IFN $\alpha$ e IFN $\beta$ con la carga viral, genotipo y daño hepático en la hepatitis crónica C

Para determinar si la expresión génica del IFN $\alpha$  o IFN $\beta$  pudiera estar relacionada con la carga viral o el genotipo, cuantificamos el RNA del virus C en suero de todos los pacientes mediante la técnica de PCR competitivo y determinamos el genotipo del VHC por un método de hibridación con sondas específicas. No encontramos correlación entre la expresión de los genes de IFN $\alpha$  o IFN $\beta$  (en hígado o CMSP) y los niveles de RNA del virus C en suero o el genotipo viral.

Al analizar la relación entre la expresión de los genes de IFN tipo I y la intensidad de daño hepático en pacientes con hepatitis crónica C, encontramos que los niveles de RNAm de IFN $\beta$  en hígado se correlacionaban directamente con los valores de aspartato aminotransferasa sérica ( $r=0,64$ ,  $p=0,008$ ), y con el índice de Knodell ( $r=0,66$ ,  $p=0,006$ ). De igual forma los valores de RNAm de IFN $\alpha$  en

hígado mostraban una correlación directa y positiva con el índice de Knodell como mencionamos anteriormente.

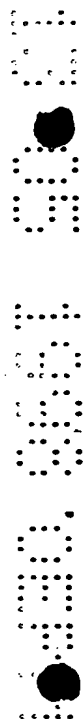




Tabla 1. Subtipos de IFN $\alpha$  en controles y pacientes con hepatitis crónica C.

	Hígado	CMSP
Control 1	9 clones IFNA5	
Control 2	9 clones IFNA5	
Control 3	11 clones IFNA5	
Control 4	12 clones IFNA5	
Control 5		3 clones IFNA5 4 clones IFNA21 2 clones IFNA1
Control 6		8 clones IFNA5
Control 7		10 clones IFNA1/13 1 clon IFNA8
Control 8		3 clones IFNA5 2 clones IFNA21 2 clones IFNA1/13 1 clon IFNA22
Control 9		2 clones IFNA10 1 clon IFNA5 1 clon IFNA2 1 clon IFNA7 1 clon IFNA8 1 clon IFNA4
RNA-VHC (+) 1	6 clones IFNA5 2 clones IFNA21 1 clon IFNA17	7 clones IFNA5 1 clon IFNA21 1 clon IFNA7
RNA-VHC (+) 2	2 clones IFNA5 4 clones IFNA21	5 clones IFNA5 4 clones IFNA21
RNA-VHC (+) 3	5 clones IFNA5 2 clones IFNA21 2 clones IFNA1	

Descripción de las Figuras

5      **Figura 1:** Expresión de RNAm de interferon alfa/  $\beta$ -actina  
(eje de ordenadas) en células mononucleares de sangre  
periférica (A) y en hígado (B), de controles sanos y  
pacientes con hepatitis crónica C (HCV-RNA +) (eje de  
abcisas).

10      **Figura 2:** Expresión de RNAm de interferon beta/ $\beta$ -actina  
(eje de ordenadas) en células mononucleares de sangre  
periférica (A) y en hígado (B), de controles sanos (C) y  
pacientes con hepatitis crónica C (HCV-RNA +) (eje de  
abcisas).

15      **Figura 3:** Relación entre la cantidad inicial de RNA total  
(abcisas) y la intensidad de banda del producto de PCR  
obtenido tras la amplificación del RNAm de IFN $\alpha$ , (●) IFN $\beta$   
(▲) y  $\beta$ -actina (◆) (en ordenadas como cuentas x mm<sup>2</sup>) en  
muestras de CMSP (A) y de hígado (B).

## LISTADO DE SECUENCIAS

### INFORMACION GENERAL:

#### SOLICITANTE:

NOMBRE: INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO  
DE NAVARRA, S.A.  
CALLE: Avenida Pío XII, 53  
CIUDAD: Pamplona  
ESTADO O PROVINCIA: Navarra  
PAIS: España  
CODIGO POSTAL: 31008  
TELEFONO: 948-10 56 00  
FACSIMIL: 948-17 52 23

TITULO: "USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE  
LAS HEPATOPATIAS VIRALES".

NUMERO DE SECUENCIAS: 1

#### DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:

DESTINATARIO: INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO  
DE NAVARRA, S.A.  
CALLE: Avenida Pío XII, 53  
CIUDAD: Pamplona  
ESTADO O PROVINCIA: Navarra  
PAIS: España  
CODIGO POSTAL: 31008

#### FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

TIPO DE MEDIO: DISCO 3.5"  
ORDENADOR: PC  
SISTEMA OPERATIVO: WINDOWS  
SOPORTE LOGICO: WORD

INFORMACION SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

NOMBRE: ALBERTO DE ELZABURU

NUMERO DE REGISTRO: 232/1

NUMERO DE REFERENCIA/REGISTRO: P-99043

INFORMACION SOBRE TELECOMUNICACIONES:

TELEFONO: 91 7009400

FACSIMIL: 91 3193810

TELEX O CORREO ELECTRONICO: elzaburu@elzaburu.es

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 1

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 274 pares de bases

TIPO: nucléotidos

NÚMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: cADN

HIPOTETICA: NO

ANTI-SENTIDO: NO

FUENTE DE ORIGEN:

Organismo: Homo sapiens

Tipo de tejido: hígado

POSICION EN EL GENOMA: Cromosoma 9

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: IFN $\alpha$ 5

Método de identificación: RT-PCR, Secuenciación

OTRAS INFORMACIONES:

Nucleótidos 672 a 945 de la secuencia del gen de IFN $\alpha$ 5 publicada en la base de datos Genbank con número de acceso X02956.

[illegible]

REIVINDICACIONES

5           1.- Uso del IFN-alfa 5 o de la secuencia génica que lo codifica y/o sus secuencias génicas esencialmente derivadas, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

10           2.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de la hepatitis C crónica.

            3.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de la cirrosis de origen viral.

15           4.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento del carcinoma hepatocelular.

20           5.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la composición fabricada se utiliza para inducir genéticamente la síntesis fisiológica, dirigida a nivel nuclear, en células hepáticas enfermas deficitarias en dicha síntesis, de interferon alfa 5.

25           6.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fabricación de la composición consiste en desarrollar una proteína recombinante de aplicación humana, mediante la clonación de un vector de expresión en un huésped apropiado.

30           7.- Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en que el huésped clonado es un organismo eucariota, preferentemente *Escherichia Coli*.

            8.- Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el huésped clonado es un organismo procariota, preferentemente *Solanum tuberosum*.

35           9.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la composición fabricada es una composición ingerible como alimento.

10.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado en que la composición fabricada es una composición de terapia génica somática.

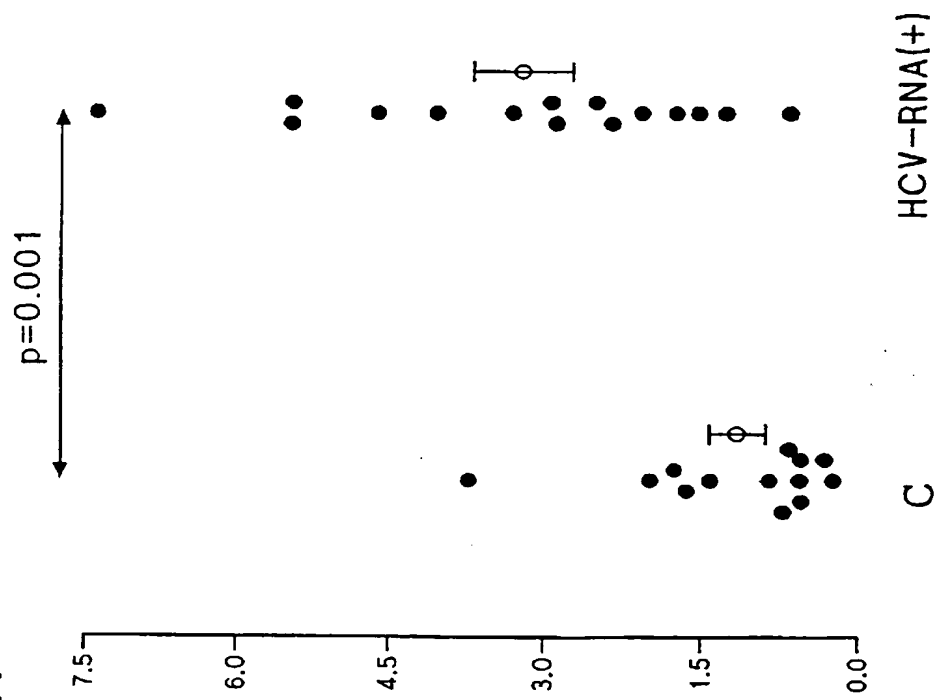
10

10

10

10

A



B

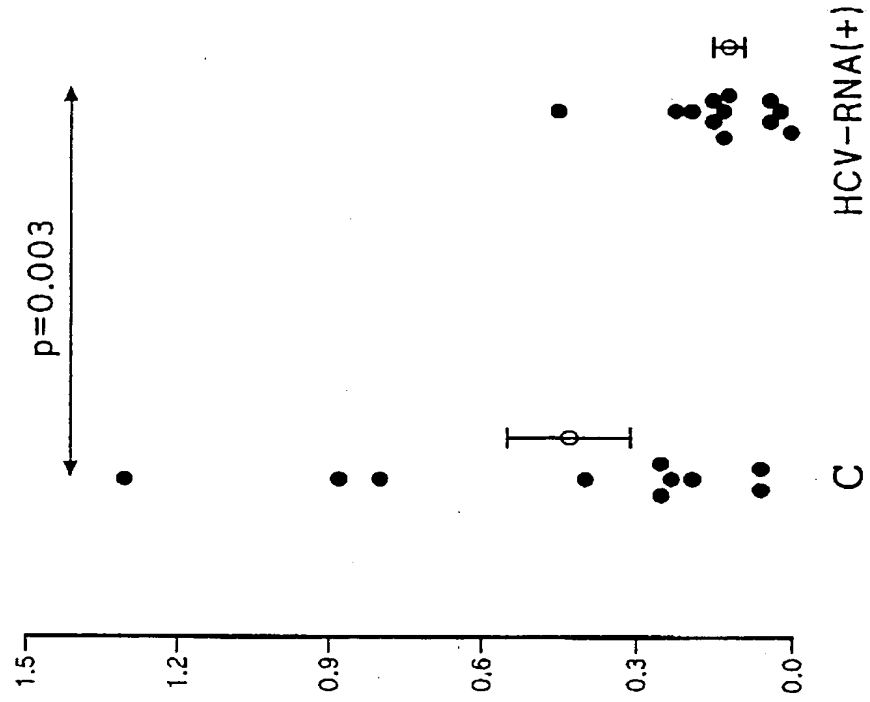


Figura 1



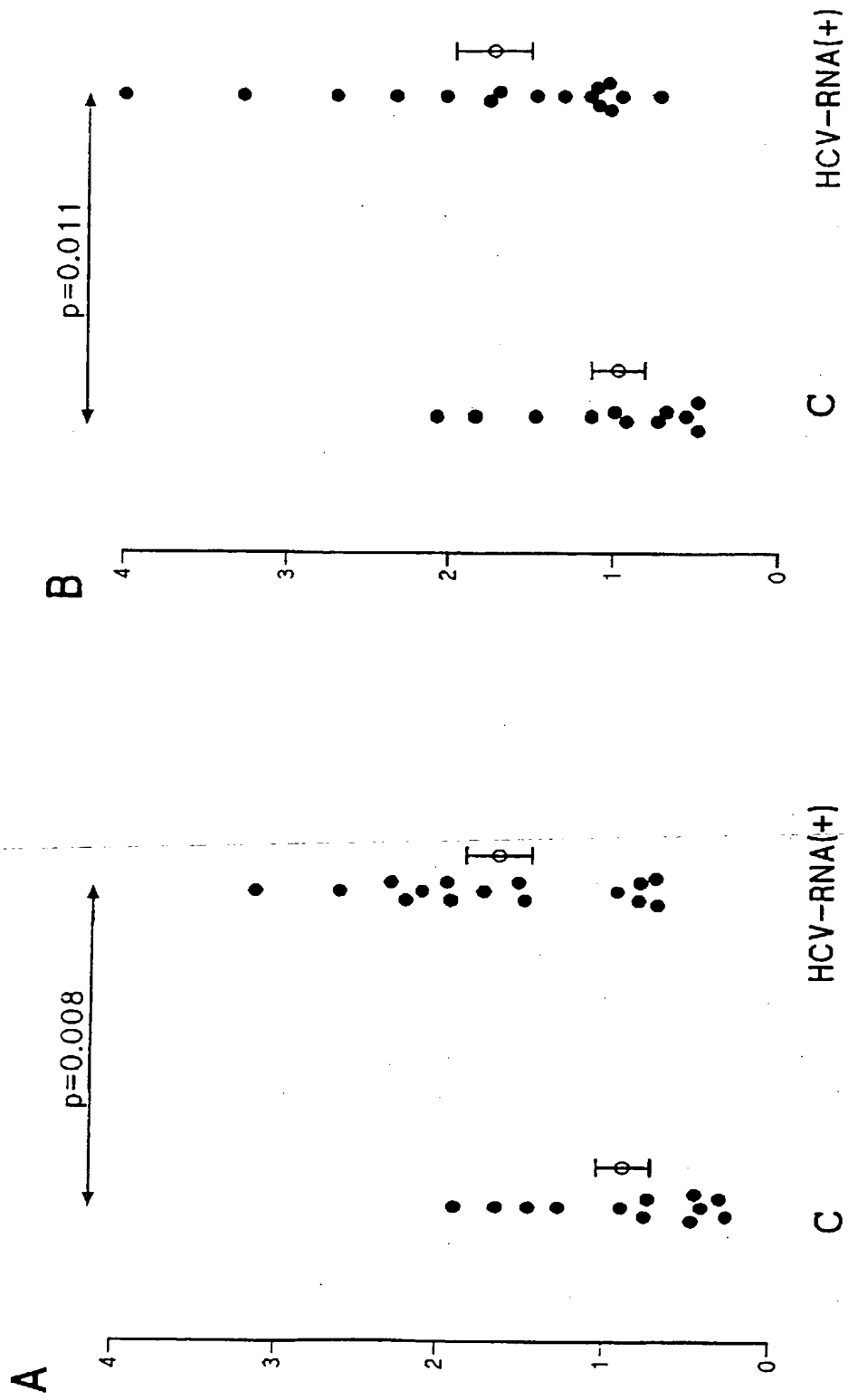


Figure 2

1430 0001 90 01

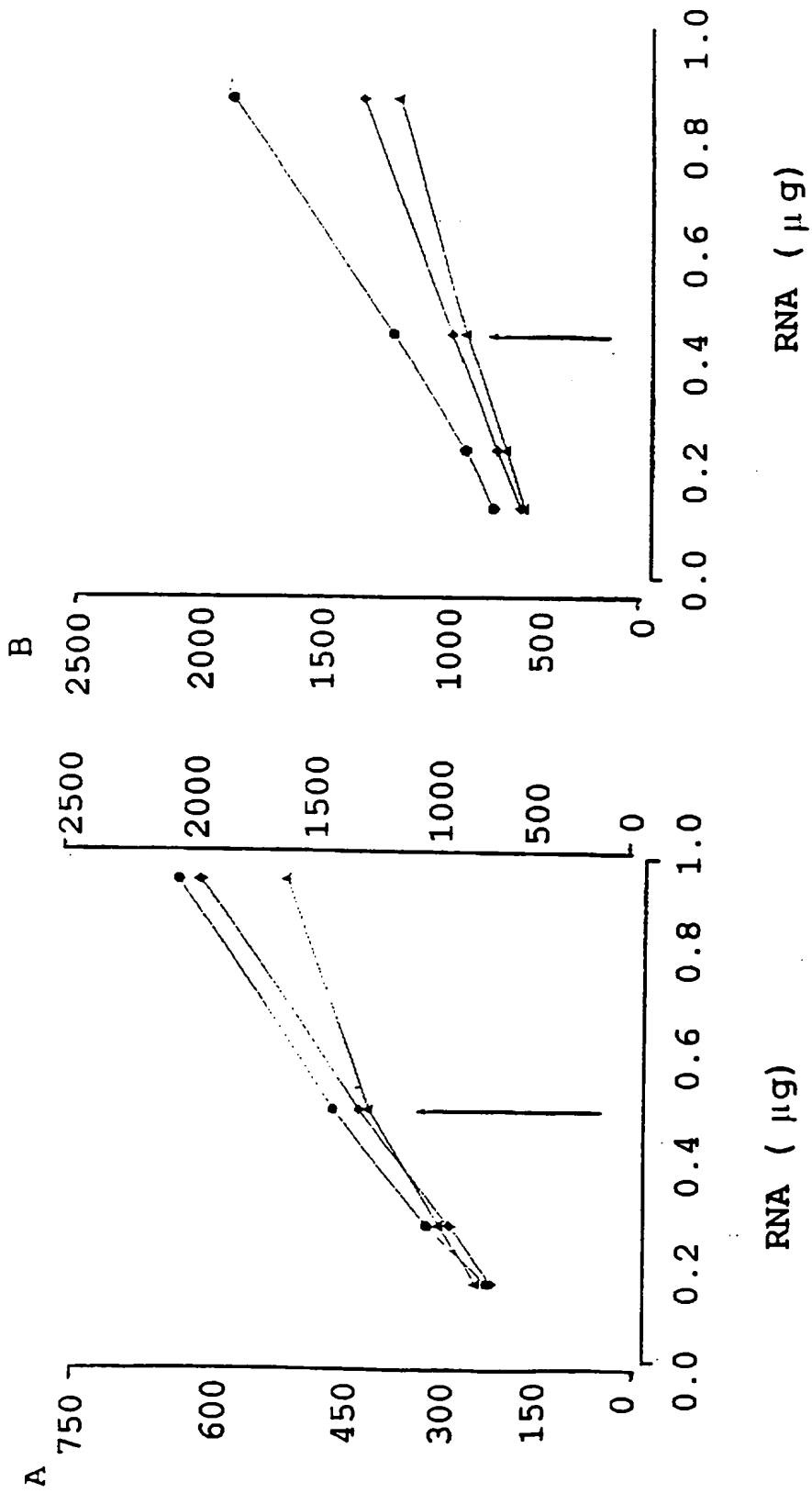


Figura 3